

ASSOZIATIONSGESCHWINDIGKEITEN
VON ^3H -ÖSTRADIOL-17 β
UND UNMARKIERTEN
ÖSTRADIOL-C6-KONJUGATEN
MIT
ANTI-ÖSTRADIOL-C6-KONJUGAT-ANTIKÖRPERN

Karl-Philipp Gloning

1970

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule der
Universität München
Direktor: Prof. Dr. Josef Zander

Assoziationsgeschwindigkeiten von ^3H -Östradiol-17 β
und unmarkierten Östradiol-C6-Konjugaten mit Anti-
Östradiol-C6-Konjugat-Antikörpern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Karl-Philipp Gloning
aus
München

Jahr

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Erich Kuss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Zander

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 1978



INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

ABKÜRZUNGS-VERZEICHNIS DER VERWENDETEN
ABKÜRZUNGEN (FÜR DIE VERWENDETEN
ABKÜRZUNGEN-VERZEICHNIS)

1. Material und Methode

1.1. Fragestellung

Meinen Eltern

1.2. Zweck

1.3. Verfahren

1.3.1. Bestimmung der Ausprägung der Merkmale

Ergebnisse 1.1

1.3.1.1. Quantifizierung

1.3.1.2. Bestimmung von μ und σ

1.3.1.3. Verteilung der Werte

1.3.1.4. Bestimmung der Eigenschaften der Verteilung

Ergebnisse 1.2

1.3.1.5. Bestimmung der Eigenschaften der Verteilung

2. Ergebnisse

2.1. Charakteristika der Ausprägung der Merkmale

2.2. Ausprägung der Merkmale

2.3.1. χ^2 -Test

2.3.2. Verteilung der Werte

2.3.3. Vergleich und Verteilung aller Merkmale



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0087

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

ASSOZIATIONSGESCHWINDIGKEITEN VON ^3H -ÖSTRADIOL-17 β UND
UNMARKIERTEN ÖSTRADIOL-C6-KONJUGATEN MIT ANTI-ÖSTRADIOL-
C6-KONJUGAT-ANTIKÖRPERN

1. Material und Methoden

1.1. Reagentien

1.2. Geräte

1.3. Methoden

1.3.1. Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeits- konstante k_{12}

1.3.1.1. Reaktionsbeschreibung

1.3.1.2. Bestimmung von q und B

1.3.1.3. Durchführung der Messung

1.3.2. Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeits- konstante k_{21}

1.3.3. Bestimmung der Inhibitionskonstante K'_i

2. Ergebnisse

2.1. Charakteristik des Antikörpers; Sättigungskurven

2.2. Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12}

2.2.1. ^3H -Östradiol-17 β

2.2.2. Unmarkierte Haptene

2.3. Übersicht und Vergleich aller ermittelten Werte

3. Diskussion

3.1. Methodenkritik

3.2. Diskussion der Meßwerte

3.2.1. ^3H -Östradiol-17 β

3.2.2. Unmarkierte Haptene

3.3. Vergleich mit anderen Autoren

3.4. Einfluß der Haptenstruktur

3.5. Vergleich der kinetischen Konstanten mit den Gleichgewichtskonstanten

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

DANKVERMERK

LEBENS LAUF

EINLEITUNG

Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Haptenen werden seit mehreren Jahren am Beispiel von Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörpern und Östrogen-Derivaten studiert (1). Zunächst wurde in Gleichgewichtsstudien die Affinität von Antikörpern zu Östrogen-Derivaten mit unterschiedlichen Ring D Substituenten untersucht (2). Der Einfluß dieser Strukturelemente im Immunogen auf die Affinität der Antikörper ist deswegen interessant, weil sich hier die Spezifität der Bindung besonders deutlich manifestiert. Dies ist eine Folge der Position dieser Strukturelemente im Immunogen. Ring D Elemente sind deshalb so exponiert, weil sie am weitesten von der "Brücke" am C-Atom 6 des Steroids entfernt sind. Als "Brücke" werden die Teile des Immunogens bezeichnet, die die steroidale Immundeterminante mit dem Rest des Moleküls verbinden. In neuerer Zeit ist der Einfluß der "Brücke" selbst auf die Affinität von Antikörpern zu Haptenen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt (3). Ob neben dem Steroid auch Teile der "Brücke" bei der Immunisierung "erkannt" werden, ist in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Einmal stellt sich die immunologisch-theoretische Frage, ob die Bindungsstelle eines Antikörpermoleküls so groß ist, daß sie mehr als das Steroidmolekül "erkennt", zum anderen die analytisch-praktische Frage, ob es möglich ist, an der "Brücke" markierte Haptene

als Indikatoren bei radioimmunologischen Bestimmungen zu verwenden. Die Ergebnisse von Gleichgewichtsstudien brachten dazu keine eindeutigen Antworten. Reaktionskinetische Untersuchungen sollten weiteren Aufschluß über das "eigentliche Hapten" liefern. Sie sollten helfen, jenes Molekül zu definieren, das den Teil der "Brücke" an C6 trägt, der noch von der Bindungsstelle des Antikörpers "erkannt" wird. Nach den Studien von H. Hötzing (4) über die Dissoziationsgeschwindigkeit von Komplexen der Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörper mit Liganden, die eine ansteigende Zahl von Elementen der Brückenregion enthalten, blieb die Frage des Einflusses der Brückenglieder auf die Assoziationsreaktion zu klären.

Die Assoziation der Immunkomplexe wurde bisher meist mit großem apparativen Aufwand untersucht, z.B. mit der Temperatursprung-Spektrophotometrie und -Fluorimetrie und mit der stopped-flow Fluorimetrie (5,6,7). 1975 wurde von Skubitz e.a. eine Methode angegeben (8), die geeignet ist, die Geschwindigkeit der Assoziationsreaktion markierter Haptene und korrespondierender Antikörper mit Hilfe der Mikrofiltration und Radiometrie zu messen. Um auch die Assoziationsgeschwindigkeiten unmarkierter Haptene bestimmen zu können, sollte die Methode von Skubitz e.a. durch Kombination mit der sog. Sequentialmethode erweitert werden.

Der vorliegenden Arbeit lagen somit zwei Aufgaben zugrunde:

1. Eine Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, die Assoziationsreaktion von Antikörpern mit markierten und unmarkierten Haptenen zu messen.
2. Aufschluß darüber zu gewinnen, inwieweit die Assoziationsreaktion steroidalere Haptene durch Elemente der "Brücke" steroidalere Immundeterminanten beeinflusst wird, d.h. welche Teile der "Brücke" von der Antikörperbindungsstelle als zum Hapten gehörig "erkannt" werden.

1. Material und Methoden

1.1. Reagentien

Unmarkierte Haptene

- 1) 1,3,5(10)-oestratrien-3,17 β -diol (Östradiol-17 β) (E2)
- 2) 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-oestratrien-6-on
(Östradiol-17 β -6-oxo) (E2-6-oxo)
- 3) 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-oestratrien-6-on-oxim-
O-methyläther (Östradiol-17 β -6-oxim-O-Methyläther)
(E2-6-oxim-O-Me)
- 4) 3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-oestratrien-6-on-oxim-
O-carboxy-methyläther (Östradiol-17 β -6-carboxymethoxim)
(E2-6-cmo)
- 5) N ϵ -[(3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-oestratrien-6-yliden-
aminooxy)-acetyl]-N α -hippuryl-lysin (Östradiol-17 β -
6-carboxymethoxim-Hippuryllysin) (E2-6-cmo-Lys)

1) wurde von E. Merck, Darmstadt, BRD, bezogen, 2) wurde bei der Fa. Ikapharm, Ramat-Gan, Israel, gekauft. 3 - 5) wurden vom Labor zur Verfügung gestellt (Präparation siehe Dissertation Dirr, München 1977). Stammlösungen wurden durch Einwiegen der Substanzen (zwischen 0,3 und 0,9 mg) auf einer Elektrobalance-Waage der Fa. Ventron Instruments Cooperation, Paramount, California, USA,

und Lösen in spektralreinem Äthanol (Uvasol) bereitet. Aus ihnen wurden Arbeitslösungen gewonnen, indem definierte Volumina mit Stickstoff eingedampft und der Rückstand über Nacht mit Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst wurde. Sie wurden bei 0 - 4 °C aufbewahrt.

Markiertes Hapten

[2,4,6,7 - $^3\text{H}_4$]-Östradiol-17 β (90 Ci/mmol) wurde von NEN, Boston, Mass., USA, bezogen und bei -18 °C in Methanol/Benzol (10:90) gelagert. Arbeitslösungen wurden durch Eindampfen eines bestimmten Volumens der Stammlösung mit Stickstoff und Lösen des Rückstandes in Phosphatpuffer (pH 7,2) bereitet.

Antiseren

Es wurden Antiseren verwendet, die durch Immunisierung von Kaninchen mit Östradiol-17 β -C6-BSA-Konjugat als Antigen gewonnen wurden (2). Die verschiedenen Kaninchen sind mit Großbuchstaben bezeichnet, der Index bezieht sich auf die Blutentnahme.

Folgende Anti-Östradiol-Antiseren wurden verglichen: D 2

E 2

F 2

Andere Reagentien

Dextrankohle: 0,5 g Norit A, 0,05 g Dextran und 100 ml

Phosphatpuffer (pH 7,2) wurden bei 4 °C dauernd gerührt. Norit A (4-5 μ m) von Serva, Heidelberg, BRD; Dextran T 70 von Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Immunglobulin vom Rind: In 20 ml Phosphatpuffer wurden 60 mg Immunglobulin vom Rind (Behringwerke AG, Marburg, BRD) gelöst.

Phosphatpufferlösung: 1/15 molare Phosphatpufferlösung (pH 7,2) wurde mit 5 mmol/l NaN_3 versetzt. Wässrige Lösungen wurden mit "aqua pro injectione", B.Braun, Melsungen, BRD, bereitet.

Szintillationszählung: Für die Szintillationszählung wurde zu jeder Probe 15 ml einer nach folgender Vorschrift hergestellten Szintillationslösung gegeben: 100 g PPO und 1,25 g POPOP wurden in 1 l Toluol gelöst. (2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxyazoly)benzol (POPOP) von W.Zinsser, Frankfurt, BRD). 42 ml dieser Lösung und 117 ml Bio-Solv (BBS 3 von Beckmann Instruments GmbH, München, BRD) wurden in 1 l Toluol gegeben. Gezählt wurde 2 - 4 min lang in einem Packard Modell 2425.

1.2. Geräte

Versuchsanordnung

Zwei doppelwandige Gefäße und ein Messingblock mit Kühl-

schlange wurden mit Hilfe eines Kryostaten bei konstanter Temperatur gehalten. In dem einen Gefäß (K, Abb.1) befindet sich Dextrankohle, die mit einem Magneten ständig gerührt wird, in dem anderen (R, Abb.1) wird das Reaktionsgemisch, das ebenfalls ständig gerührt wird, angesetzt.

Der Messingblock (B, Abb.1) enthält 10 Trennsäulchen, deren Konstruktionsmerkmale aus Abb. 2 ersichtlich sind. Ein Trennsäulchen kann maximal das Volumen 1,7 ml aufnehmen. Über eine Andruckschraube mit einer feinen zentralen Bohrung werden 2 Filterpapierscheiben und ein Dichtungsring von unten angepreßt, die das Säulchen dicht abschließen. Mit dem Kolben einer Einmalspritze, der dicht in das Säulchen paßt, wird das Reaktionsgemisch durch die Filter gepreßt. Alle Teile werden mit Methanol und Aqua dest. gereinigt und unter Heißluft getrocknet.

Materialien für den Filtrationstrennblock

Filter: Fa. Carl Schleicher & Schüll, Selecta Nr. 595, ϕ 16 mm. Dichtungen: Viton - Ringe. Spritzenkolben: Einmalspritzen 2 ml, Fa. Henke, 178 71-C10.

Weitere Geräte

Reaktionsgefäße (1,5 ml): Eppendorf Gerätebau, Hamburg, BRD. Mikroliter-Zentrifuge (10 000 - 15 000 kg): Fa. Hettich, Tuttlingen, BRD. Schüttler: Eppendorf Gerätebau, Hamburg, BRD.

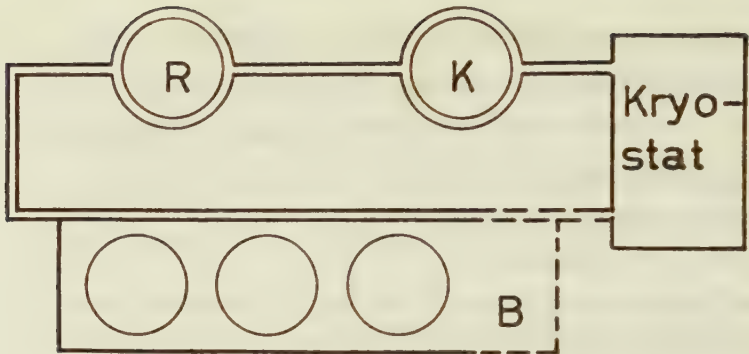


Abb. 1. Schema der Versuchsanordnung

K = Gefäß mit Dextrankohle, R = Gefäß mit dem Reaktionsgemisch, B = Messingblock für Trennungsreaktion.

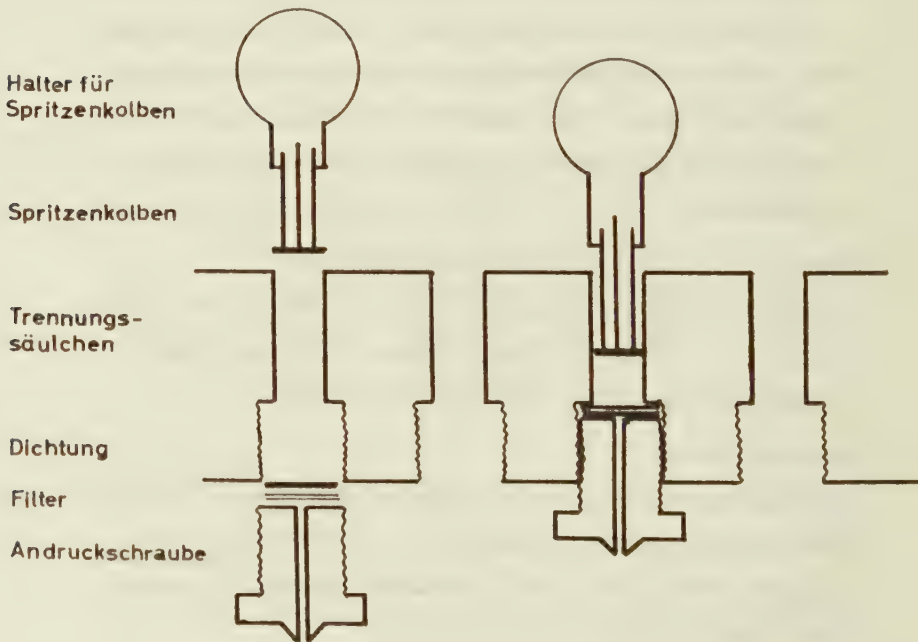


Abb. 2. Messingblock für Trennungsreaktion

(Detailzeichnung; Erläuterung der Abbildung im Text)

1.3. Methoden

1.3.1. Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeits- konstante k_{12}

1.3.1.1. Reaktionsbeschreibung

Zur Zeit t_0 wird die Assoziationsreaktion durch Mischen der beiden Reaktionspartner p und q gestartet. Zu diesem Zeitpunkt ist die Assoziationsgeschwindigkeit

$$\frac{d(PQ)}{dt} = k_{12} (P) (Q) \quad \text{am grÖßten.}$$

Mit der Zeit steigt die Konzentration des Komplexes (PQ) an und in gleichem Maße nimmt die Geschwindigkeit der Dissoziationsreaktion

$$- \frac{d(PQ)}{dt} = k_{21} (PQ)$$

zu, bis sich zur Zeit $t_{\text{äq}}$ das kinetische Gleichgewicht eingestellt hat. Von diesem Zeitpunkt an gilt:

$$\frac{d(PQ)}{dt} = 0$$

$$k_{12} (P) (Q) = k_{21} (PQ)$$

$$\frac{k_{12}}{k_{21}} = \frac{(PQ)}{(P)(Q)} = K_{\text{Ass}}$$

Für jeden beliebigen Zeitpunkt zwischen t_0 und $t_{\text{äq}}$ gilt:

$$\frac{d(PQ)}{dt} = k_{12} (P) (Q) - k_{21} (PQ)$$

und, wenn die Dissoziationsreaktion sehr viel langsamer

abläuft als die Assoziationsreaktion

$$\frac{d(PQ)}{dt} = k_{12} (P) (Q) = k_{12} (p - B) (q - B)$$

$$\begin{aligned} p &= (P) + (PQ) \\ q &= (Q) + (PQ) \\ B &= (PQ) \end{aligned}$$

Auswertung

$p/q = 1$ Durch Integration erhält man

$$k_{12} t = \frac{1}{q-p} \ln \frac{p(q-B)}{q(p-B)}$$

$$k_{12} t (q - p) = \ln \frac{p}{q} + \ln \frac{(q - B)}{(p - B)}$$

Im Diagramm $\ln \left(\frac{q - B}{p - B} \right)$ vs. t wird - unter der Voraussetzung, daß die Assoziationsreaktion eine Reaktion 2. Ordnung ist - eine Gerade mit der Neigung $k_{12}(q - p)$ und mit dem Ordinatenabschnitt $\ln(p/q)$ erwartet. Aus der Neigung wird k_{12} errechnet.

$p/q < 0,1$ $(q - B) \approx$ konstant $\approx q$

$$\frac{d(PQ)}{dt} = k_{12} q(p - B)$$

Durch Integration erhält man

$$\ln(p - B) = \ln p - k_{12} q t$$

Im Diagramm $\ln(p - B)$ vs. t wird unter den gegebenen Voraussetzungen - Reaktion pseudo 1. Ordnung - eine Gerade mit der Neigung $-k_{12}q$ und dem Ordinatenabschnitt $\ln p$ erwartet. Aus der Neigung wird k_{12} errechnet.

1.3.1.2. Bestimmung von q und B

Zur Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} ist es notwendig, p und q zu kennen und die zeitabhängige Änderung von B zu bestimmen.

Bestimmung von q über B bei $t_{\text{äq}}$

In die Gleichgewichtsreaktion $(P^+)(Q) \rightleftharpoons (P^+Q)$ werden steigende Konzentrationen (P^+) eingesetzt. Dies entspricht einer Sättigung von (Q) , die durch verschiedene Linearisierungen dargestellt werden kann. In der Antragung nach Scatchard - B/F vs. B - wird, bei Homogenität des Antikörpers, eine Gerade erwartet, deren Schnittpunkt mit der Abszisse q bei $t_{\text{äq}}$ entspricht.

Bestimmung von (P^+Q) zwischen t_0 und $t_{\text{äq}}$

Wird die Assoziationsreaktion eines markierten Haptens verfolgt, wird mit Hilfe eines Adsorbens das freie Hapten rasch aus der Reaktion entfernt. In einem Aliquot der verbleibenden Lösung kann (P^+Q) direkt gemessen werden.

Bestimmung von (PQ) zwischen t_0 und $t_{\text{äq}}$ mit einer Sekundärreaktion

Ist das zu untersuchende Hapten nicht markiert, wird der nach der Abtrennung von P verbleibende Antikörper q' mit P^+ möglichst vollständig in (P^+Q) übergeführt

(Sekundärreaktion). Aus der Differenz ($q - P^+Q$) ergibt sich (PQ) zwischen t_o und $t_{äq}$.

1.3.1.3. Durchführung der Messung

Zu einem Puffervolumen a werden 1,0 ml der Lösung des Immunglobulins vom Rind und 1,0 ml einer Verdünnung des Antiserums gegeben. Nach 10 min hat sich die Temperatur in dem Reaktionsgemisch an die eingestellte Temperatur angeglichen und das Hapten wird möglichst rasch in einem kleingehaltenen Volumen b zugesetzt. a und b ergeben zusammen 8,0 ml.

0,5 ml Dextransuspension werden in ein Trennsäulchen vorgelegt und 1,0 ml aus dem Reaktionsgemisch aufgegeben. Die Probenvolumina enthalten jeweils 1/10 des Ansatzes. Die Proben werden im Abstand von etwa 20 sec aus dem Reaktionsansatz entnommen. Mit dem Kolben werden Kohle und Reaktionsgemisch durch die Filter gepreßt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Kontaktzeit beträgt etwa 3 sec.

Sämtliche Reaktionen werden bei 5 °C durchgeführt.

Wird mit markierten Haptenen gearbeitet, so wird aus dem aufgefangenen Volumen ein Aliquot von 1,0 ml in einem Szintillationszähler gezählt.

Bei unmarkierten Haptenen wird ein Aliquot von 1,0 ml aus dem Eluat genommen und in ein Eisbad gestellt. Jeweils 5 Proben werden für die Hilfsreaktion mit einer bestimmten Menge markierten Indikatorhaptens (in 0,2 ml) versetzt, 1 min geschüttelt und 5 min bei 5° C inkubiert. Mit 0,3 ml Dextranskohle wird die Reaktion beendet, 1 min geschüttelt und 2 min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wird 1,0 ml Aliquot gezählt.

Wird unmarkiertes Hapten und Antikörper bis zum kinetischen Gleichgewicht (30 min) inkubiert und

- a) die Lösung direkt mit markiertem ^3H -Östradiol versetzt und nach 10 min die Reaktion durch Zugabe von Kohle beendet,
- b) die Reaktionslösung mit Kohle durch ein Trennsäulchen gedrückt (Adsorption des freien unmarkierten Haptens), 10 min gewartet und dann mit ^3H -Östradiol versetzt und wie a) weiterbehandelt,

so konnte beim Vergleich der Konzentration des markierten Hapten-Antikörper-Komplexes kein Unterschied festgestellt werden.

Abhängigkeit von (P^+Q) von den Konzentrationen q und P^+ in der Folgeinkubation (Dosis-Wirkungs-Kurven)

Die unmarkierten Haptene werden in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 - 7,62 nmol/l mit Anti-Östradiol-

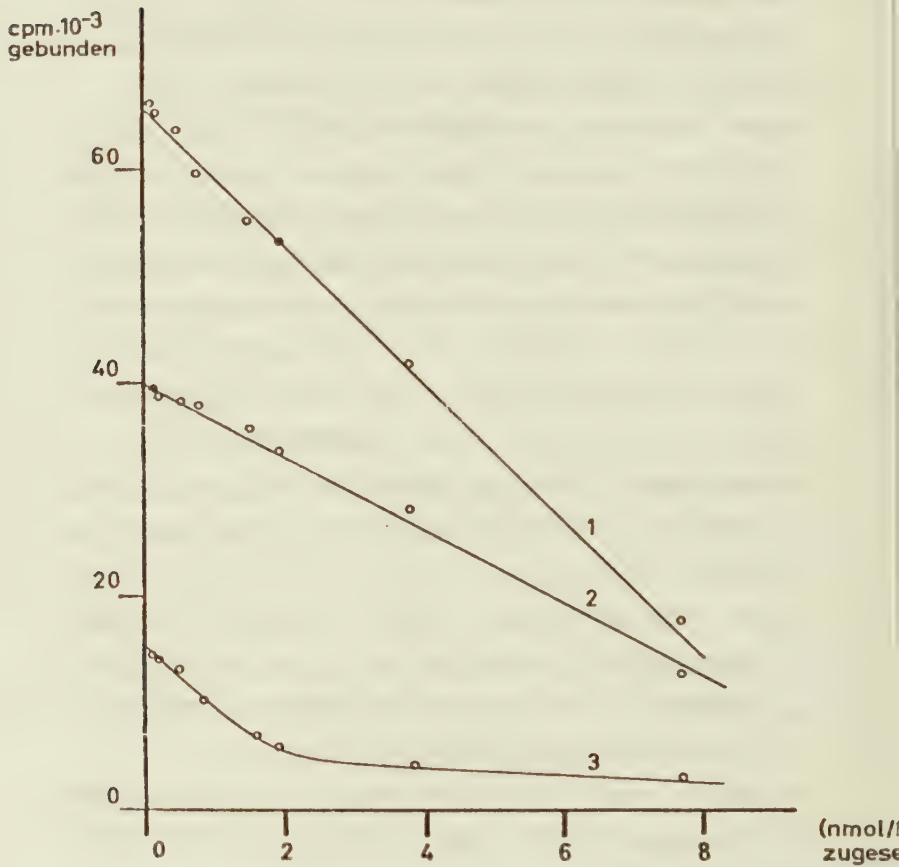


Abb. 3. Abhängigkeit von (P^+Q) von den Konzentrationen Q und P^+ in der Folgeinkubation (Dosis-Wirkungs-Kurven): Auf der Ordinate ist (P^+Q) angetragen ($\text{cpm } 10^{-3}$), auf der Abszisse die zugesetzte Konzentration von unmarkiertem Hapten (E2-6-oxim-O-Me).

Kurve 1: $Q/P^+ = 5,4/3,7 \text{ nmol/l}$

Kurve 2: $Q/P^+ = 5,4/1,84 \text{ nmol/l}$

Kurve 3: $Q/P^+ = 1,35/1,84 \text{ nmol/l}$

Antikörper (E2) bis zum Gleichgewicht inkubiert (30 min bei 5° C). Für die Folgeinkubation werden zu allen Proben jeweils 1,84 bzw. 3,7 nmol/l ^3H -Östradiol gegeben und nochmals 5 min bei 5° C inkubiert. Danach wird mit Dextrankohlezugabe (1 min schütteln) und 2 min Zentrifugation die Reaktion beendet. In einem Aliquot des Überstandes wird (P^+Q) gezählt (Abb.3).

1.3.2. Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21}

Die von H. Hötzing (4) angegebene Methode zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} wurde in Bezug auf Reaktionslösungen, Inkubationen und Standardkurven übernommen. Reagentien und Geräte entsprechen den oben angegebenen. Geändert wurde die Trennung vor der Folgeinkubation: hier wurden die Proben durch den Filtrationstrennblock gedrückt und nicht wie bei Hötzing abzentrifugiert. Die Bestimmung wurde nur für ein Anti-Östradiol-Antiserum (D2) bei einer Temperatur (5° C) durchgeführt.

1.3.3. Bestimmung der Inhibitionskonstante K'_i

Als Inhibitor wurden die unmarkierten Haptene in aufsteigenden Konzentrationen von 0,38 bis 7,62 nmol/l, als Substrat = Indikator wurden jeweils 1,57/3,8/7,6 nmol/l ^3H -Östradiol eingesetzt. Das Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 1,0 ml: Puffer, Immunglobulin vom Rind,

a, P, P⁺) wurde 30 min bei 5⁰ C inkubiert und nach Zugabe von 0,5 ml Dextrankohle (1 min schütteln) 2 min abzentrifugiert. Die Bestimmung wurde nur für ein Anti-Östradiol-Antiserum (D2, $\sigma = 7,1$ nmol/l) durchgeführt. Die Daten wurden in der von A. Cornish-Bowden (9) angegebenen Weise ausgewertet und die Inhibitionskonstante K'_i sowie die Art der Bindung aus der graphischen Darstellung abgelesen.

2. Ergebnisse

Adsorption der Steroide an Dextrankohle

Unter den angegebenen Bedingungen sind nach einer Kontaktzeit von etwa 3 sec von 1,84/3,7/7,4 nmol/l ^3H -Östradiol 7,5/6,4/7,0 % nicht an die Dextrankohle gebunden. Von den unmarkierten Haptenen sind von 3,7/7,4 nmol/l jeweils <8 % nicht an die Kohle adsorbiert.

2.1. Charakteristik des Antikörpers: Sättigungskurven

Bestimmung von a mit P^+

Wird die eingesetzte Antikörperkonzentration mit 1,84/3,7/7,4/11,1/14,7/22,2 nmol/l ^3H -Östradiol inkubiert und B und F berechnet, erhält man in der Auswertung nach Scatchard die in Tab. 1 aufgeführten Werte der Konzentrationen spezifischer Bindungsstellen a und der Assoziationskonstanten K_{Ass} .

Antiserum	D 2	W 2	W 2
Konz. der spezifischen Bindungsstellen a (10^{-9} mol/l)	7,1	5,4	6,7
Assoziationskonstante K_{Ass} für ^3H -Östradiol (10^9 mol $^{-1}$ l)	0,35	0,34	0,31

Tab. 1. Charakteristik der Anti-Östradiol-Antisera

Bestimmung von q mit P und P^+

7,1 nmol/l Antikörperbindungsstellen (D2) und 3,7 nmol/l E2-6-oxim-O-Me werden bis zur Einstellung des kinetischen Gleichgewichts inkubiert (30 min). Anschließend werden die nicht besetzten Antikörperbindungsstellen mit ^3H -Östradiol titriert. Die Ergebnisse sind im Scatchard - Diagramm dargestellt (Abb. 4).

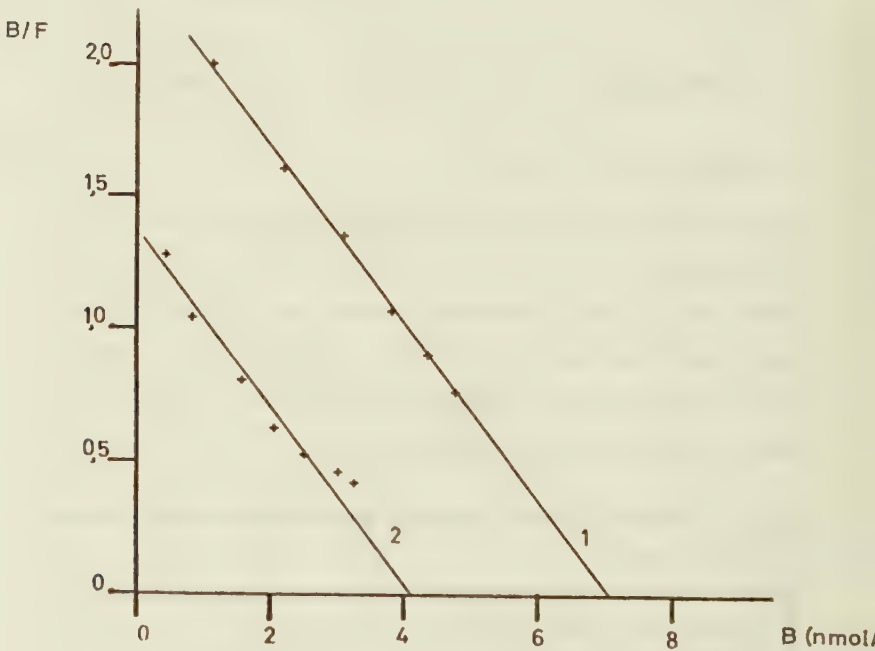


Abb. 4. Scatchard - Diagramme

- 1) Sättigung des Antikörpers D2 mit ^3H -Östradiol
 $q = 7,1 \text{ nmol/l}$; $K = 0,35 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{l}$; $R = 0,998$;
- 2) Sättigung des Antikörpers D2 mit ^3H -Östradiol nach
Vorinkubation des Antikörpers mit 3,7 nmol/l
E2-6-oxim-O-Me bis zum Gleichgewicht (30 min).

$q' = 4,2 \text{ nmol/l}$; $K = 0,31 \times 10^9 \text{ mol}^{-1}\text{l}$; $R = 0,977$;
Aus der Differenz der Abszissenabschnitte von 1 und 2
wird errechnet, daß aus der ersten Reaktion $2,9 \text{ nmol/l}$
Antikörper-E2-6-oxim-O-Me-Komplex vorliegt.

Wenn in der ersten Reaktion äquimolare Konzentrationen
von E2-6-oxo, E2-6-oxim-O-Me, E2-6-cmo, E2-6-cmo-Lys
($P = 7,62 \text{ nmol/l}$) mit Anti-Östradiol-Antiserum (D2,
 $q = 7,1 \text{ nmol/l}$) bis zum Gleichgewicht inkubiert werden,
und in der zweiten Reaktion (Titration) eine so große
Konzentration ^3H -Östradiol ($P^+ = 14,7 \text{ nmol/l}$) einge-
setzt wird, daß damit eine Sättigung der nicht besetz-
ten Antikörperbindungsstellen (q') erreicht wird, so
erhält man gleiche Werte der gebundenen Anteile (Tab. 2).

Unmarkierte Haptene $P = 7,62 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$	PQ 10^9 mol/l
E2-6-oxo	4,83
E2-6-oxim-O-Me	4,73
E2-6-cmo	4,88
E2-6-cmo-Lys	4,80

Tab. 2. $P = 7,62 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ und $q = 7,1 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$
(D2) werden bis zum Gleichgewicht inkubiert (30 min)
und anschließend wird q' mit $14,7 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ ^3H -Östra-
diol gesättigt. PQ der ersten Reaktion ist bei allen
unmarkierten Haptenen gleich.

2.2. Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12}

2.2.1. ^3H -Östradiol-17 β

Der zeitliche Verlauf der Assoziationsreaktion für ^3H -Östradiol-17 β ($P^+ = 3,7 \text{ nmol/l}$) mit Anti-Östradiol-Antikörper E2 ($q = 5,4 \text{ nmol/l}$) ist in Abb. 5 dargestellt. Das kinetische Gleichgewicht ist nach etwa 3 min erreicht. Für alle untersuchten Antiseren wurden analoge Kurven erstellt (Tab. 3).

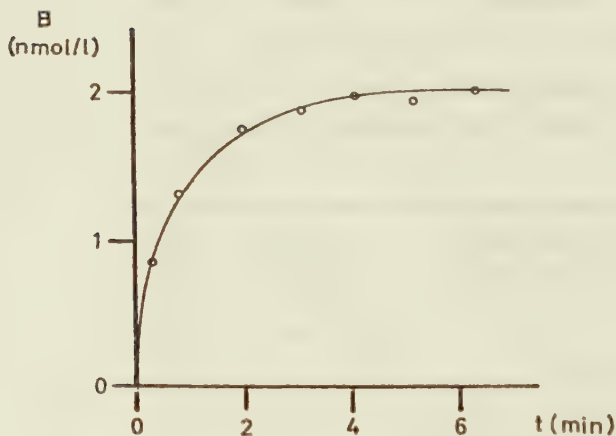


Abb. 5. Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Assoziationsreaktion von ^3H -Östradiol ($P^+ = 3,7 \text{ nmol/l}$) und Anti-Östradiol-Antikörper E2 ($q = 5,4 \text{ nmol/l}$)

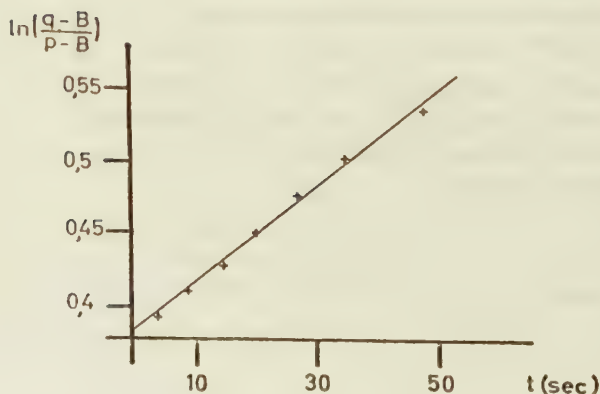


Abb. 6. Bestimmung von k_{12} als Parameter einer Reaktion 2. Ordnung
 $k_{12} = 1,901 \times 10^6 \text{ (l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}\text{)}$
 $R = 0,995$ (bei linearer Regressionsanalyse)

Die Kinetik der Assoziationsreaktion wurde auch unter der Bedingung untersucht, daß ein Reaktionspartner (Anti-Östradiol-Antikörper) im Überschuß vorliegt. Abb. 7 zeigt den zeitlichen Verlauf der Assoziationsreaktion von ^3H -Östradiol ($P^+ = 0,23 \text{ nmol/l}$) mit Anti-Östradiol-Antiserum E2 ($q = 5,4 \text{ nmol/l}$). Sowohl in der Auswertung als Reaktion 2. Ordnung (Abb. 8) als auch als Reaktion pseudo 1. Ordnung (Abb. 9) läßt sich diese Assoziationsreaktion als Gerade darstellen.

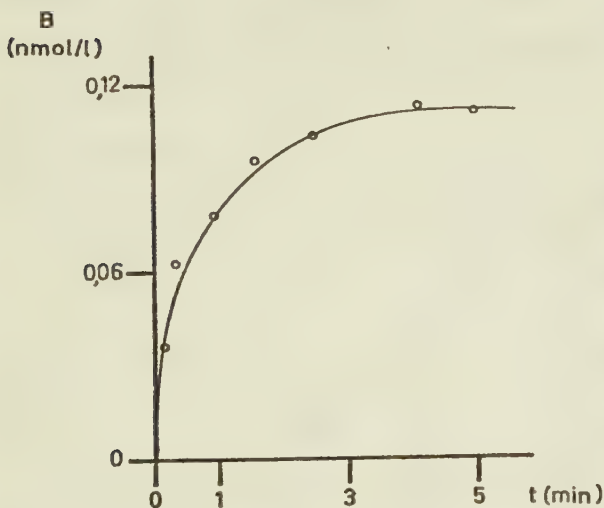


Abb. 7. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Assoziationsreaktion von ^3H -Östradiol ($P^+ = 0,23 \text{ nmol/l}$) und Anti-Östradiol-Antikörper E2 ($q = 5,4 \text{ nmol/l}$)

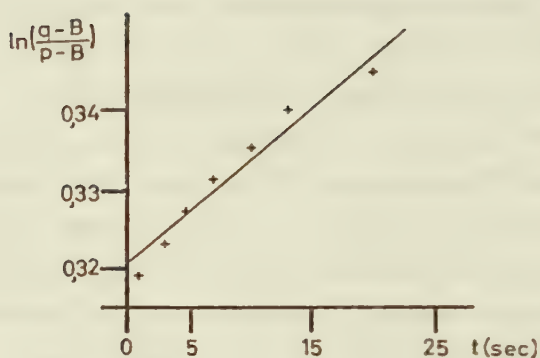


Abb. 8. Bestimmung von k_{12} als Parameter einer Reaktion
2. Ordnung; $k_{12} = 2,655 \times 10^6 \text{ (l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}\text{)}$
 $R = 0,977$ (bei linearer Regressionsanalyse)

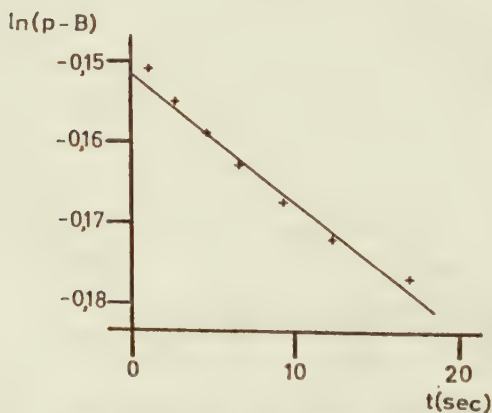


Abb. 9. Bestimmung von k_{12} als Parameter einer Reaktion
pseudo 1. Ordnung; $k_{12} = 2,925 \times 10^6 \text{ (l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}\text{)}$
 $R = 0,990$ (bei linearer Regressionsanalyse)

2.2.2. Unmarkierte Haptene

Der zeitliche Verlauf der Assoziationsreaktion von E2-6-oxo ($P = 3,7 \text{ nmol/l}$) mit Anti-Östradiol-Antiserum D2 ($q = 7,1 \text{ nmol/l}$) ist in Abb. 10/11 dargestellt. Das kinetische Gleichgewicht ist nach etwa 5 min erreicht. Abb. 12/13 zeigt den Verlauf der Assoziationsreaktion von E2-6-oxim-O-Me ($P = 7,4 \text{ nmol/l}$) und Anti-Östradiol-Antiserum D2 ($q = 7,1 \text{ nmol/l}$). Das kinetische Gleichgewicht ist nach ca. 12 min eingestellt. Ähnlich verhielten sich E2-6-cmo und E2-6-cmo-Lys.

Für alle untersuchten unmarkierten Haptene wurden analoge Kurven erstellt, die Werte der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

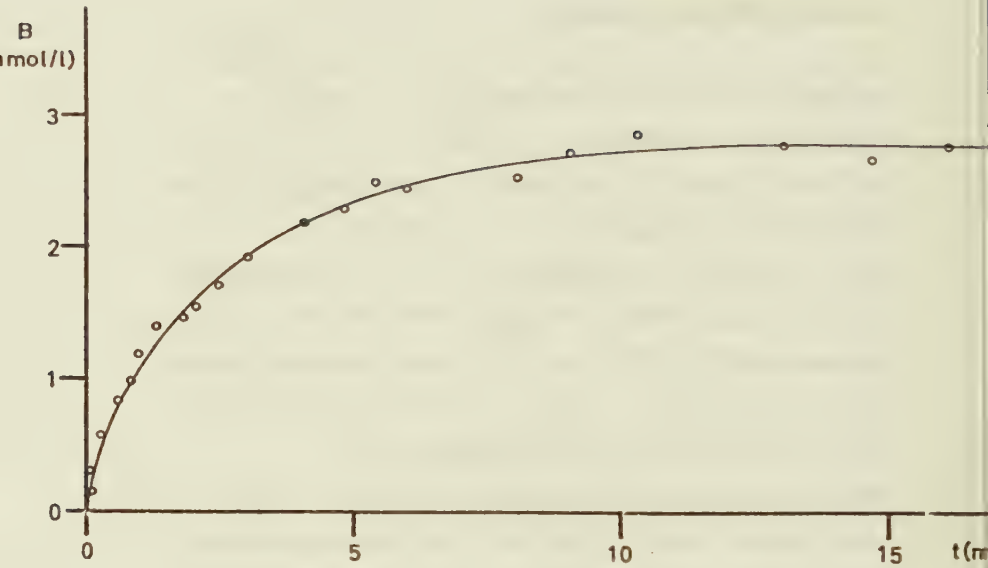


Abb. 10. Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Assoziationsreaktion von E2-6-oxo ($P = 3,7 \text{ nmol/l}$) und Anti-Ostradiol-Antikörper D2 ($\alpha = 7,1 \text{ nmol/l}$). In die Abb. sind die Ergebnisse von vier gleichen Versuchen aufgenommen.

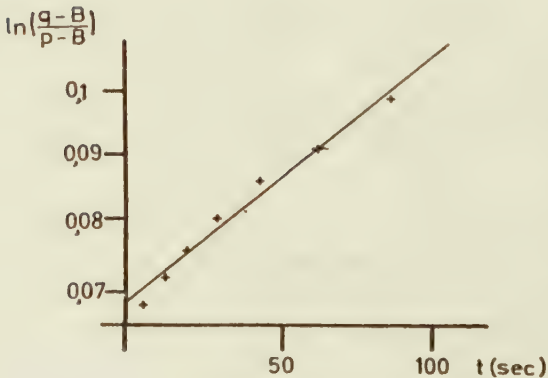


Abb. 11. Bestimmung von k_{12} als Parameter einer Reaktion 2. Ordnung (zeitl. Verlauf vgl. Abb. 10)
 $k_{12} = 1,073 \times 10^6$
 $(\text{l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$
 $R = 0,991$ (bei linearer Regressionsanalyse)

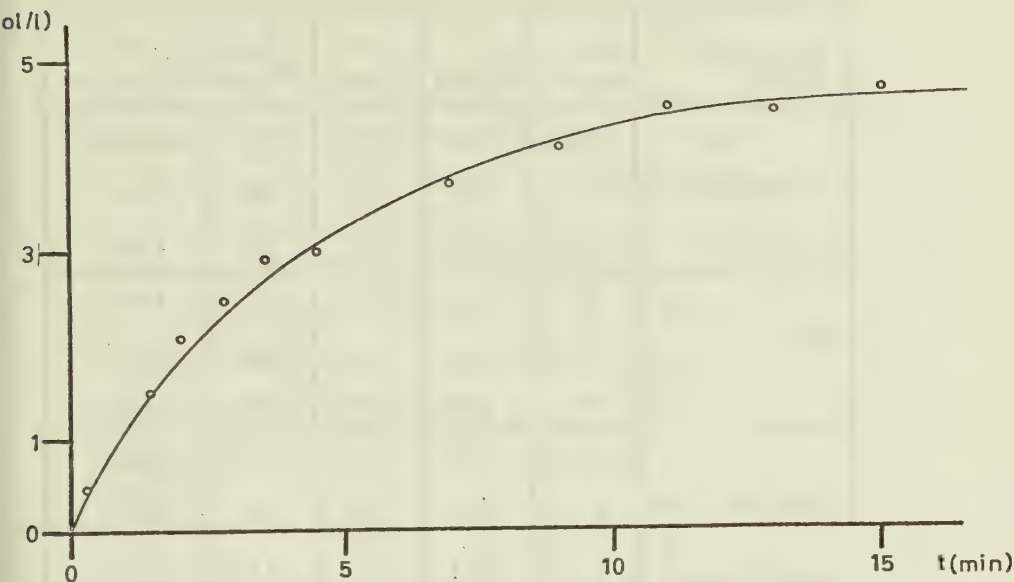


Abb. 12. Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Assoziationsreaktion von E2-6-oxim-O-Me ($P = 7,4 \text{ nmol/l}$) und Anti-Östradiol-Antikörper D2 ($\alpha = 7,1 \text{ nmol/l}$).

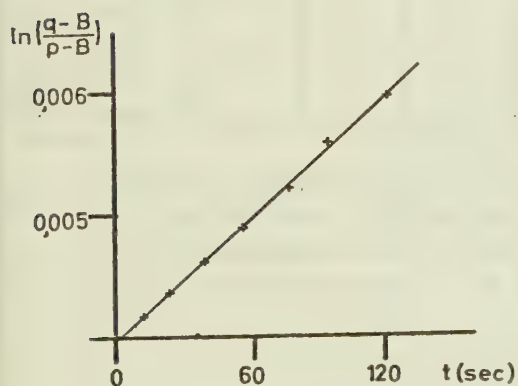


Abb. 13. Bestimmung von k_{12} als Parameter einer Reaktion 2. Ordnung (zeitl. Verlauf vgl. Abb. 12)
 $k_{12} = 0,450 \times 10^6$
 $(\text{l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$
 $R = 0,999$ (bei linearer Regressionsanalyse)

Oestradiol-Derivat	Anti-serum	q 10 ⁹ mol/l	p 10 ⁹ mol/l	B _{t=∞} 10 ⁹ mol/l	k ₁₂ 10 ⁻⁶ l mol ⁻¹ sec ⁻¹
E2 markiert	D 2	7,1	3,7	2,27	1,935
	E 2	5,4	3,7	2,02	1,901
	F 2	6,73	3,7	2,24	1,386
E2-6-oxo	D 2	7,1	3,7	2,9	1,073
	E 2	5,4	3,7	2,2	0,830
	F 2	6,73	3,7	2,8	0,686
E2-6-oxim-O-Me	D 2	7,1	7,4	4,9	0,450
	E 2	5,4	3,7	2,2	0,451
	F 2	6,73	3,7	2,8	0,427
E2-6-cmo	D 2	7,1	7,4	4,9	0,452
	E 2	5,4	7,4	3,74	0,318
	F 2	6,73	7,4	4,75	0,338
E2-6-cmo-Lys	D 2	7,1	3,7	2,9	0,365
	E 2	5,4	7,4	3,74	0,363
	F 2	6,73	3,7	2,8	0,349

Tab. 3. Zusammenfassung aller als Parameter einer Reaktion 2. Ordnung ermittelten Werte der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} für alle untersuchten Östradiol - Derivate und Anti-Östradiol-Antiseren.

2.3. Übersicht und Vergleich aller ermittelten Werte

In Tab. 4 sind alle Ergebnisse für ^3H -Östradiol und die unmarkierten Haptene zusammengestellt: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} , Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} , Assoziationsgeschwindigkeitskonstante $K = \frac{k_{12}}{k_{21}}$, Assoziationskonstante K_{Ass} , Inhibitionskonstante K'_i und die Bindungsart der Haptene an den Anti-Östradiol-Antikörper. Alle Werte wurden mit dem gleichen Antiserum D2 ($q = 7,1 \text{ nmol/l}$) ermittelt. Alle Reaktionen wurden bei 5°C durchgeführt.

Östradiol-Derivat	k_{12} $1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 10^{-6}	k_{21} sec^{-1} 10^4	$K = \frac{k_{12}}{k_{21}}$ mol^{-1} 10^{-9}	K_{Ass} mol^{-1} 10^{-9}	K'_i mol^{-1} 10^{-9}	Bindungsart
E2 markiert	1,935	3,30"	5,81	0,35	0,33	competitiv
E2-6-oxo	1,073	2,10 1,44"	5,10 7,45	-	1,00	competitiv
E2-6-oxim-O-Me	0,450	0,44 0,57"	10,00 7,90	-	0,45	uncomp.
E2-6-cmo	0,452	- 0,64"	- 7,06	-	0,33	uncomp.
E2-6-cmo-Lys	0,365	0,72 0,88"	5,07 4,15	-	0,60	uncomp.

Tab. 4. Übersicht und Vergleich aller ermittelten Werte. Anti-Östradiol-Antikörper D2 ($q = 7,1 \text{ nmol/l}$), Temp. 5°C . Die mit " gekennzeichneten Werte sind von H.Hötzing (4) übernommen.

Die in Tab. 4 angegebenen Werte sind in Abb. 14 graphisch dargestellt als Funktion der Länge der Seitenkette am Kohlenstoffatom 6 des Östradiol-17 β .

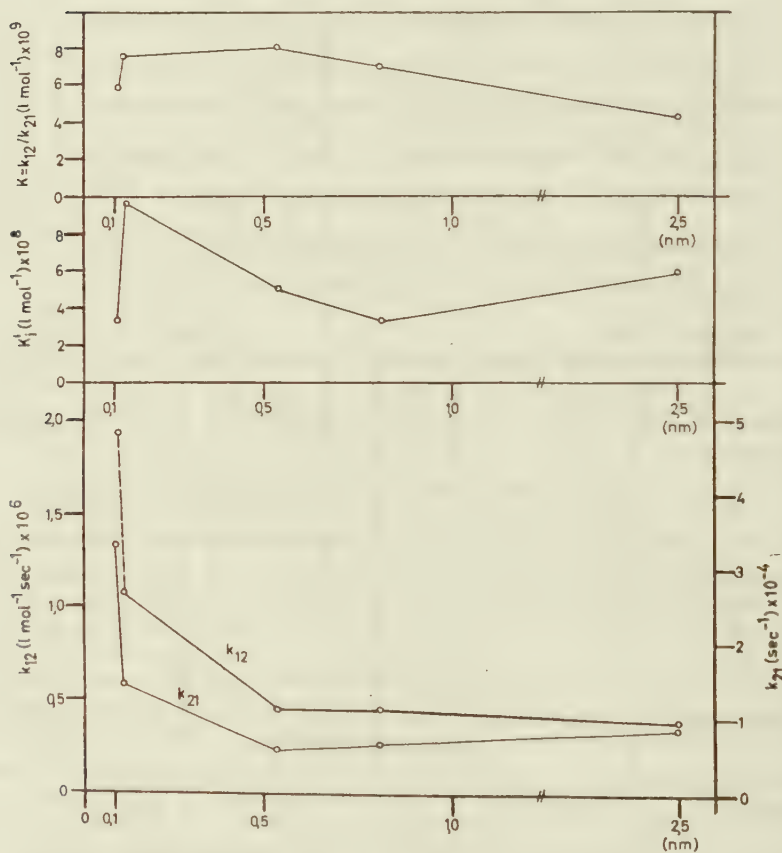


Abb. 14. Darstellung von $K = \frac{k_{12}}{k_{21}}$, K' , k_{12} und k_{21} als Funktion der Länge der Seitenkette am Kohlenstoffatom 6 des Östradiol-17 β . Die Länge der Seitenkette ist in nm angegeben. Die k_{21} -Werte wurden von H. Hötzingen übernommen. Die angegebenen Derivate sind von links nach rechts: E2 markiert/ E2-6-oxo/ E2-6-oxim-O-Me/ E2-6-cmo/ E2-6-cmo-Lys.

3. Diskussion

3.1. Methodenkritik

Trennung von gebundenem und freiem Hapten

Bei Anwendung der Kohletrenntechnik sind folgende Fehler zu erwarten: 1) keine vollständige Adsorption des freien Haptens, 2) Adsorption von Hapten-Antikörper-Komplex, 3) Dissoziation des Haptens vom Antikörper während der Trennung mit Kohle (10). Bei der von uns eingesetzten Konzentration von Dextranskohle waren die Möglichkeiten 2) und 3) durch kurze Trennzeiten (im Filtrationstrennblock etwa 3 sec) möglichst klein gehalten, das freie Hapten war nahezu vollständig entfernt (>92 % bei unmarkierten Haptenen).

Vor der Berechnung von k_{12} wurden der Anteil nicht an die Kohle adsorbierten Haptens und die Hintergrundaktivität des Szintillationszählers von den Rohdaten abgezogen. Eine für markiertes Östradiol-17 β durchgeführte Fehlerrechnung (analog Smith und Skubitz (11)) ergab, daß nach vollständiger Korrektur die Abweichung von den Rohdaten bei allen Konzentrationen 10 % nicht überstieg. Dies ist vor allem für die Zuverlässigkeit der Versuchsanordnung wichtig, da wesentliche Änderungen der von Skubitz e.a. (8) im Prinzip übernommenen Methode - für die Bestimmung der unmarkierten Haptens notwendig waren.

Reaktionsordnung

Das Elementarmodell der Antikörper-Hapten-Wechselwirkung geht von homogenen, univalenten und unabhängigen Reaktionspartnern aus. Dementsprechend wird die Assoziationsreaktion $P + Q \rightarrow PQ$ als bimolekulare Reaktion durch das sogenannte Zeitgesetz 2. Ordnung charakterisiert $\frac{d(PQ)}{dt} = k_{12} (P) (Q) = k_{12} (p - B)(q - B)$.

Bei entsprechenden Versuchsbedingungen, d.h. Überschuß von P oder Q, kann die Assoziation im Rahmen des Modells als pseudomonomolekulare Reaktion aufgefaßt und nach dem Zeitgesetz pseudo 1. Ordnung behandelt werden, indem die Variable (Q) durch die Konstante q ersetzt wird (oder (P) durch p): $\frac{d(PQ)}{dt} = k_{12} q (p - B)$.

Zur Vereinfachung der Reaktionsbeschreibung wurde zunächst hypothetisch angenommen, daß die Rückreaktion, die Dissoziation des Komplexes PQ, wegen ihrer Langsamkeit vernachlässigt werden kann (8,11). H. Höttinger, der in diesem Labor das gleiche Modell studierte, fand für die hier untersuchten Komplexe von Östrogenen mit Anti-Östrogen-Antikörpern für k_{21} Werte von $3,30 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$. Im Rahmen einer Plausibilitätskontrolle konnten diese Werte in vorliegender Arbeit bestätigt werden (Tab. 4; Abb. 14). Damit waren Voraussetzungen dafür gegeben, die Brauchbarkeit des Elementarmodells zu prüfen: bei hinreichender Präzision der Messungen und bei Gültigkeit des Elementarmodells

sollte sich die bimolekulare Reaktion im $\ln \left(\frac{a - B}{p - B} \right)$ vs. t Diagramm, die pseudomonomolekulare Reaktion im $\ln (p - B)$ vs. t Diagramm als Gerade darstellen.

Auch die bimolekulare Reaktion läßt sich als pseudomonomolekulare Reaktion im $\ln (p - B)$ vs. t Diagramm als Gerade darstellen (8,11). Allerdings ist die Linearität, ausgedrückt durch den Korrelationskoeffizienten R, etwas geringer (Tab. 5). Alle Versuchsansätze, deren Verhältnis $p/q = 1$ war, wurden nach dem Zeiteinsatz 2. Ordnung ausgewertet. Dabei lag der Korrelationskoeffizient R zwischen 0,979 und 0,999.

Die untersuchten Anti-Östradiol-Antiseren zeigten keine Unterschiede: Antiserum D2: $R = 0,979 - 0,999$

" E2: $R = 0,981 - 0,998$

" F2: $R = 0,995 - 0,999$

Bestimmung von k_{12} als Parameter einer Reaktion					
2. Ordnung		pseudo 1. Ordnung		n	q
k_{12} $1 \text{ mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 10^{-6}	R	k_{12} $1 \text{ mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ 10^{-6}	R		
1,901	0,995	1,620	0,992	2,7	5,4
1,895	0,985	1,747	0,982	1,84	5,4
2,655	0,977	2,925	0,990	0,23	5,4

Tab. 5. Vergleich der k_{12} -Werte und der Korrelationskoeffizienten bei Auswertung der Versuche nach 2. Ordnung und nach pseudo 1. Ordnung. Anti-Östradiol-Antiserum F2, markiertes Östradiol-17 β (p). Temp. 5 $^{\circ}$ C.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schließt die Zufälligkeit der Befunde als bestimmende Größe aus. Die lineare Anordnung der Meßdaten in den Diagrammen zeigt, daß die Modellvorstellungen mit den Meßdaten zu vereinbaren sind. Dies steht, soweit es die markierten Haptene betrifft, auch mit den Ergebnissen von Skubitz und Smith (8,11) im Einklang, die mit gleicher Methode die Assoziation von markiertem Strophanthin an die korrespondierenden Antikörper untersucht haben. Allerdings setzten diese Autoren den pseudomonomolekularen Ansätzen P im Überschuß zu und nicht, wie hier beschrieben, Q. Die Ergebnisse zeigen, daß beides zulässig ist.

Nicht nur mit der auf markierte Haptene beschränkten Methode von Skubitz e.a. ist es möglich, die Assoziationsreaktion messend zu verfolgen, sondern auch mit der Sequentialmethode (12). Die hier erstmalig dargestellte Verlaufskontrolle der Assoziation unmarkierter Haptene mit dieser Methode ergab trotz des zusätzlichen experimentellen Schrittes eine lineare Anordnung der Meßdaten im Reaktionszeit - Diagramm (Abb. 11,13).

Nach den vorliegenden Ergebnissen spricht nichts gegen die Adäquatheit der verwendeten Methoden und nichts gegen die Brauchbarkeit des Elementarmodells zur Behand-

lung der Assoziationskinetik der Östrogene an korrespondierende Antikörper. Die Empfindlichkeit der Meßmethode, die durch die hohe spezifische Radioaktivität eines Reaktionspartners bedingt ist, erlaubt eine starke Verdünnung und macht damit die sehr schnelle Assoziationsreaktion meßbar. Die Antikörper reagieren innerhalb der methodisch bedingten Fehler als eine homogene Population von Molekülen. Man muß allerdings berücksichtigen, daß infolge der angewandten Methode zur B/F - Trennung nur solche Assoziationen gemessen werden, bei denen die Haptene größere Affinität zum Antikörper besitzen als zur Kohle. Das Fehlen eines kooperativen Effektes im Laufe der Assoziationsreaktion steht im Einklang mit Ergebnissen andersartiger Experimente (6) und auch solcher Experimente, die mit Fab Fragmenten durchgeführt wurden (13). Es wurde nachgewiesen, daß die Bindungsstellen der tatsächlich zumindest bivalenten Antikörper als univalent und von einander unabhängig behandelt werden können (6,13,14).

3.2. Diskussion der Meßwerte

3.2.1. ^3H -Östradiol-17 β

Die Ergebnisse der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} für ^3H -Östradiol-17 β zeigten bei den untersuchten Anti-Östradiol-Antisera gute Übereinstimmung ($k_{12} = 1,9$ bzw. $1,4 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (Tab. 3).

Der Wert von k_{12} , der unabhängig sein sollte von der Konzentration beider Reaktionspartner (15), scheint von der Konzentration der Bindungsstellen (q) bzw. der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig zu sein. Bei einem Verhältnis von $p^+ : q = 3,7 : 5,4$ (nmol/l) ergibt sich $k_{12} = 1,901 \times 10^6$ ($l \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (Abb.5,6); dagegen ist $k_{12} = 2,925 \times 10^6$ ($l \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (Auswertung pseudo 1. Ordnung) bei einem Verhältnis von $p^+ : q = 0,23 : 5,4$ (nmol/l) (Abb.7,9). Für diesen Effekt, den wir nicht systematisch untersucht haben, haben wir keine Erklärung. Auf die Heterogenität der Antikörperpopulation, die Malvano e.a. (16) für die Abhängigkeit von K_0 von der Konzentration der Bindungsstellen vermutete, können wir die Beobachtung nicht zurückführen.

Der für ^3H -Östradiol-17 β gefundene Meßwert der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} kann - strenggenommen - nicht mit den Werten von k_{12} der unmarkierten Östradiol-Derivate verglichen werden, da die unmarkierten Haptene über eine Sekundärreaktion (Folgeinkubation) mit markiertem Östradiol-17 β bestimmt wurden und der k_{12} -Wert für unmarkiertes Östradiol-17 β nicht gemessen wurde. (Wegen der hohen Geschwindigkeit der Assoziationsreaktion - t_{H_0} ist nach 3 min erreicht - war das unmarkierte Östradiol-17 β mit der Folgeinkubation nicht genau genug zu verfolgen.)

3.2.2. Unmarkierte Haptene

Von größerer Bedeutung als die absoluten Werte ist der Vergleich der untersuchten Östradiol-17 β - Derivate untereinander und mit dem ^3H -Östradiol-17 β . Dies ist möglich, weil alle unmarkierten Haptene mit der gleichen Methode bestimmt wurden. Die ermittelten Werte waren jederzeit reproduzierbar.

Beim Vergleich der verschiedenen Antiseren zeigten die Werte sehr gute Übereinstimmung (Tab. 3). Die größte Abweichung ergab sich bei E2-6-oxo: k_{12} lag im Bereich von $1,07 \times 10^6$ bis $0,7 \times 10^6$ ($1 \text{ mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$).

Aus den Ergebnissen, dargestellt in Tab. 3, kann geschlossen werden, daß die Werte denselben Trend zeigen: E2-6-oxo hat eine höhere Assoziationsgeschwindigkeitskonstante als die Haptene, die mehr Glieder der "Brücke" enthalten, d.h. mit zunehmender Länge der Seitenkette an C6 nahm die Assoziationsrate ab (Abb. 14).

Die von uns angegebene Methode der Bestimmung unmarkierter Haptene über eine Indikatorreaktion (Folgeinkubation) scheint gut geeignet zu sein, sowohl die Assoziationsreaktion als auch das Dissoziationsverhalten (4) in Abhängigkeit von der Molekülstruktur zu verfolgen. Damit ist es auch möglich, über die Reaktionskinetik eine Vermessung der Bindungsstelle am Antikörper durchzuführen.

Es wurde versucht, mit Aceton-emo die Bindungsstelle zu blockieren. Dieses Molekül hatte keine ausreichende Verdrängungskapazität und Bindungsfähigkeit. Diese Versuche sind nicht gelungen.

3.3. Vergleich mit anderen Autoren

Die errechneten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{12} ($1,4 - 1,9 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$) sind mehrere Größenordnungen niedriger als der theoretische Wert für diffusionskontrollierte Reaktionen ($10^9 \text{ l mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$).

Die Diffusion kann nicht der limitierende Faktor der Assoziationsreaktion sein, sondern die sterische Anordnung und die elektrostatische Abstoßung sind die bestimmenden Größen für die Assoziationsrate (6,7).

Unsere Werte liegen 2 Größenordnungen niedriger als die für DNP-Lysin/Myelom Protein 315 (Temperatursprung-Fluorimetrie)(6) angegebenen Werte, etwa eine Größenordnung niedriger als die für Progesteron/Progesteron bindendes Globulin (stopped-flow fluorometry) (7) und die für IN-2,5S-4DNP/Anti-2,4-Dinitrophenyl-Antikörper (Temperatursprung-Spektrophotometrie)(5) angegebenen Werte (Tab. 6).

Die für ^3H -Strophantin/Anti-Strophantin-Antikörper von Skubitz e.a. (8,11) angegebenen Werte, deren Methode

im wesentlichen übernommen wurde, liegen etwa 5-fach höher als unsere für ^3H -Östradiol-17 β /Anti-Östradiol-Antikörper gefundenen (Skubitz: $0,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$; eigene Werte: $1,6 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$)(Tab. 6).

Die von Geynet e.a. (17) angegebenen k_{12} - Werte für Östradiol/Östradiol-Rattenuterus-Cytosol-Rezeptor liegen um das 2 1/2-fache ($6,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$), die von Korach, Muldoon (18) gefundenen Werte für Östradiol-17 β /Ratten-Hypophysenvorderlappen-Cytoplasma-Rezeptor um das 5-fache ($3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) niedriger als unsere Werte.

Bemerkenswert ist, daß die von Skubitz e.a. angegebenen Werte bei 22° C gemessen wurden, die von Geynet e.a. und von Korach, Muldoon bei 0° C. Die eigenen, bei 5° C gemessenen Werte liegen dazwischen. Die Temperaturabhängigkeit der Assoziationsreaktion wird auch von anderen Autoren beschrieben (7,15). Auch eine Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungsstellen (α) wurde von uns vermutet. Letztlich reichen die beiden erwähnten Möglichkeiten aber nicht aus, die Abweichungen zu den Werten anderer Untersucher zu erklären.

Antikörper	Hapten	k_{12} ($M^{-1} \text{ sec}^{-1}$)	$T(^{\circ}C)$	Methode	Literatur
Myelom Protein 315 Polymer Monomer Fab'	DNP-Lysin	$1,3 \times 10^8$ $1,3 \times 10^8$ $1,5 \times 10^8$	25	Temperatursprung- Fluorimetrie	Pecht e.a. (6)
Anti-2,4-di- nitrophenyl	IN-2,5S-4DNP	$1,7 \times 10^7$	23	Temperatursprung- Spektrophotometr.	Froese (5)
Progesteron bindendes Globulin	Progesteron	$2,2 \times 10^7$ $4,3 \times 10^7$ $8,7 \times 10^7$	4 14 20	stopped-flow fluorometry	Stroupe, Westphal (7)
Anti-Strophan- tin Anti-Strophan- tin Anti-Digoxin	3H -Strophan- tin 3H -Strophan- tin 3H -Digoxin	$0,8 \times 10^7$ $0,82 \times 10^7$ $2,0 \times 10^7$	22 22 22	Kohletrenn- technik " "	Skubitz e.a. (8) Smith, Skubitz (11)

Antikörper	Hapten	k_{12} ($M^{-1} \text{sec}^{-1}$)	$T(^{\circ}C)$	Methode	Literatur
Anti-Strophantigin IgG Fab	3H -Strophantigin	$3,43 \times 10^6$ $3,36 \times 10^6$	22	Kohletrenntechnik	Skubitz e.a. (13)
Anti-Östradiol	3H -Östradiol E2-6-oxo E2-6-oxim-O-Me E2-6-cmo E2-6-cmo-Lys	$1,9 \times 10^6$ $1,0 \times 10^6$ $0,4 \times 10^6$ $0,4 \times 10^6$ $0,3 \times 10^6$	5	Kohletrenntechnik + Folgeinkubation	diese Arbeit
Ratten-Uterus-Cytosol-Rezeptor	Östradiol	$6,4 \times 10^5$	0	Adsorptions-technik	Geynet e.a. (17)
Ratten-Hypophysenvorderlappen-Cytoplasma-Rezeptor	Östradiol-17 β	$3,5 \times 10^5$	0	Präzipitations-technik	Korach, Muldoon (18)

Tab. 6. Vergleich der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{12}
(Werte und Methoden)

3.4. Einfluß der Haptenstruktur

Die Östradiol-17 β - Derivate, die Elemente der "Brücke" enthielten, zeigten eine Strukturabhängigkeit in ihrem Assoziationsverhalten an Anti-Östradiol-Antikörper, die über E2-6-omo als "Brücke" zu den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste des Albumins hergestellt wurden. Dabei ist die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} ein Maß für die Bequemlichkeit, mit der die Bindungsstelle erkannt wird. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} ist dagegen ein Maß für die Affinität des Liganden zu seiner Bindungsstelle (19).

E2-6-oxo hat eine schnellere Assoziationsrate als alle anderen Moleküle, die längere Teile der "Brücke" enthalten. Von E2-6-oxim-O-Me ab ändert sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante auch mit zunehmender Länge der Seitenkette nur noch unbedeutend (Abb. 14). Dieses Ergebnis läßt sich in Übereinstimmung mit H. Höttinger (4) dahingehend deuten, daß das "eigentliche" Hapten für den Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antikörper größer als E2-6-oxo ist und maximal eine Größe von E2-6-oxim-O-Me besitzt.

3.5. Vergleich der kinetischen Konstanten mit den Gleichgewichtskonstanten

K_{Ass} für Östradiol-17 β , ermittelt über die Antragung

und Auswertung nach Scatchard, ist mehr als eine Größenordnung kleiner als K, berechnet aus dem Quotienten k_{12}/k_{21} . Einen ähnlichen Unterschied zwischen statisch und dynamisch ermittelten Werten von K hat auch Froese (5) beschrieben. Für diese Diskrepanz ist uns keine Erklärung möglich. Alle Werte wurden bei gleicher Temperatur und mit dem gleichen Antiserum bestimmt. Lediglich der Wert von k_{21} wurde von H. Hötzingher übernommen. Gerade dieser Wert wird aber als entscheidend für die Größe von K bezeichnet (5,6,8). Da die Entscheidung, welcher der beiden Werte, K_{Ass} aus dem Gleichgewicht oder K aus dem Quotienten k_{12}/k_{21} , die wahre Größe der Parameter angibt, sollte der Gebrauch dieser Daten beschränkt bleiben auf den Vergleich der Größen, die mit der gleichen Methode erhalten wurden.

Überprüft wurden die Gleichgewichtskonstante K_{Ass} und die kinetische Assoziationskonstante $K = \frac{k_{12}}{k_{21}}$ auch durch Bestimmung des K'_1 - Wertes nach Dixon in der von Cornish-Bowden (9) erweiterten Antragung für alle untersuchten Haptene. Auch diese Werte lagen zwischen 5 - 10-fach unter den aus dem Quotienten k_{12}/k_{21} errechneten K - Werten. Interessant ist, daß E2-6-oxo dabei den größten K'_1 - Wert zeigte ($1,0 \times 10^9 \text{ l mol}^{-1}$) (Tab. 4). Dies stimmt mit der Beobachtung von Dirr (20) überein, daß E2-6-oxo die größte Verdrängungskraft hat.

Von Bedeutung ist weiterhin, daß in der von Cornish-Bowden angegebenen Antragsform E2-6-oxo in der Bindungsart zusammen mit Östradiol-17 β "competitiv" am Rezeptor gebunden wird. Die Haptene mit längeren Gliedern der "Brücke" dagegen müssen in ihrer Bindungsart als formal "uncompetitiv" bezeichnet werden, was auf eine andere Art der Bindung hinweist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Assoziationsgeschwindigkeiten für die Reaktionen von ^3H -Östradiol-17 β und von unmarkierten C6-substituierten Östradiol-Derivaten mit Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antikörpern bestimmt. Die Assoziation des markierten Haptens konnte durch die zeitabhängige Zunahme des Antikörper-Hapten-Komplexes - nach Abtrennung des freien Haptens mit Dextranskohle - gemessen werden. Bei den unmarkierten Haptenen war es durch eine Folgereaktion mit markiertem Hapten als Indikator und die Anwendung der Kohletrenntechnik möglich, die Assoziationsreaktion zu verfolgen.

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{12} liegt für ^3H -Östradiol-17 β bei $1,9 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, für unmarkierte Haptene zwischen 0,8 und $0,3 \times 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, abhängig von der Struktur des Steroidmoleküls: je länger die Seitenkette an C6, desto langsamer verläuft die Assoziationsreaktion.

Die Ergebnisse wurden nach den Gesetzen einer Reaktion 2. Ordnung und pseudo 1. Ordnung berechnet und die Linearität anhand des Korrelationskoeffizienten ($R = 0,977 - 0,995$) geprüft. Zur Plausibilitätskontrolle der erhaltenen Werte wurde die

Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{21} und die Inhibitionskonstante K'_i bestimmt und die Werte mit $K = \frac{k_{12}}{k_{21}}$ verglichen. Wegen der dabei festgestellten Unterschiede sollte der Gebrauch der Größen auf den Vergleich der Werte, die mit derselben Methode erhalten wurden, begrenzt bleiben.

LITERATUR

1. Kuss, E., Goebel, R.: Determination of estrogens by radioimmunoassay with antibodies to estrogen-C6-conjugates. I. Synthesis of estrone-, estradiol-17 β -, and estriol-6-albumin-conjugates. Steroids 19, (1972) 509-518
2. Kuss, E., Goebel, R., Enderle, H.: Steroids as immunochemical probes. I. Influence of oxo-, and/or hydroxy-groups at C-16/C-17 of estrogens on affinity to anti-estrone-, anti-estradiol-17 - and anti-estradiol-17 β -antisera. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, (1973) 347-364
3. Kuss, E.: Diskussionsbemerkung. J. Ster. Biochem. 5, (1974) 755
4. Hötzing, H.: Dissertation. München (1977)
5. Froese, A.: Kinetic and equilibrium studies on 2,4-dinitrophenyl hapten-antibody systems. Immunochemistry 5, (1968) 253-264
6. Pecht, I., Givol, D., Sela, M.: Dynamics of hapten-antibody interaction. Studies on a myeloma protein

with anti-2,4-dinitrophenyl specificity. J. Mol. Biol. 68, (1972) 241-247

7. Stroupe, S.D., Westphal, U.: Steroid-protein interactions. Stopped flow fluorescence studies of the interaction between steroid hormones and progesterone-binding globulin. J. Biol. Chem. 250, (1975) 8735-8739
8. Skubitz, K.M., Smith, T.W.: Determination of antibody-hapten association kinetics: A simplified experimental approach. J. Immunology 114, (1975) 1369-1374
9. Cornish-Bowden, A.: A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. Biochem. J. 137, (1974) 143-144
10. de Hertogh, R., van der Heyden, I., Ekka, E.: "Unbound" ligand adsorption on dextran-coated charcoal: practical considerations. J. Ster. Biochem. 6, (1975) 1333-1337
11. Smith, T.W., Skubitz, K.M.: Kinetics of interactions between antibodies and haptens. Biochemistry 14, (1975) 1496-1502

12. Zettner, A., Duly, P.E.: Principles of competitive binding assays (saturation analyses). II. Sequential saturation. Clin. Chem. 20, (1974) 5-14
13. Skubitz, K.M., O'Hara, D.S., Smith, T.W.: Antibody-hapten reaction kinetics: A comparison of hapten interactions with IgG and Fab preparations. J. Immunology 118, (1977) 1971-1976
14. Kelly, K.A., Schon, A.H., Froese, A.: Kinetic studies on antibody-hapten reactions. I. Reactions with antibodies and their univalent Fab' fragments. Immunochemistry 8, (1971) 613-625
15. Rodbard, D.: Mathematics of hormone-receptor interaction. In: Advances in experimental medicine and biology. Vol.36, Receptors for reproductive hormones. 289-327 (O'Malley, B.W., Means, A.R., Ed.) Plenum Press, New York, London 1973
16. Malvano, R., Rolleri, E., Rosa, U.: Standardization and control of steroid radioimmunoassay. In: "Symposium on RIA and Related Procedures in Medicine." International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. (1974) 97-122

17. Geynet, Millet, Truong, Baulieu: Estrogens, anti-estrogens, and cytosol receptor. *Gynec. Invest.* 3, (1972) 9-20
18. Korach, K.S., Muldoon, T.G.: Characterization of the interaction between 17 β -estradiol and its cytoplasmic receptor in the rat anterior pituitary gland. *Biochemistry* 13, (1974) 1932-1938
19. Pecht, I., Haselkorn, D., Friedman, S.: Kinetic mapping of antibody binding sites by chemical relaxation spectroscopy. *Febs Letters* 24, (1972) 331-334
20. Dirr, W.: Dissertation. München (1977)

DANKVERMERK

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Erich Kuss für die Überlassung des Themas, für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor und für die bereitwillige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hans Thoma bin ich für zahlreiche Ratschläge während des experimentellen Teils zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Karl-Philipp Gloning geb. am 2. 3. 1951 in Nördlingen
als Sohn des Polizeibeamten
Leonhard Gloning und seiner
Ehefrau Lidwina Gloning, geb.
Wunderle

Schulbildung Volksschule St. Martin, München,
von 1957 - 1961
Theresien - Gymnasium, München,
von 1961 - 1970
Abitur 1970 im humanistischen Zweig

Militärdienst von 1970 - 1972 Angehöriger
der Bundeswehr, Entlassung als
Leutnant d. R.

Studium 1972/73 Studium der Tiermedizin,
LMU - München
1973 - 1978 Studium der Humanmedizin
LMU - München
Staatsexamen Okt. 1978

